



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 151 798** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **C 12 N 3/00, A 61 K 39/07, C**
12 N 1/02// (C 12 N 3/00, C 12 R
1:07)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 98112304/13, 24.06.1998
(24) Дата начала действия патента: 24.06.1998
(46) Дата публикации: 27.06.2000
(56) Ссылки: SU 1792969 A, 07.02.1993. SU 400620 A, 08.05.1971. SU 1791449 A, 30.01.1993. RU 1566532 C, 20.12.1995. RU 2095409 C, 10.11.1997. RU 2036232 C, 27.05.1995.
Регламент производства живой сухой сибиреязвенной вакцины N 364 - 95. - Киров: НИИМ МО РФ, 1995.
(98) Адрес для переписки:
610024, г.Киров-24, Октябрьский проспект
119, НИИ микробиологии

(71) Заявитель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации
(72) Изобретатель: Анкер С.С.,
Лещенко А.А., Кожухов В.В., Шевцов
А.Н., Комоско Г.В., Савельев С.П.
(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации

(54) СПОСОБ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ СПОРОВЫХ КУЛЬТУР В ПРОИЗВОДСТВЕ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

(57) Реферат:
Изобретение касается технологии производства медицинских иммунобиологических препаратов. Концентрирование споровых суспензий при производстве вакцинных препаратов осуществляют на пористых мембранах в режиме проточной (кросс-флоу) фильтрации. Для отделения клеточной биомассы используют мембраны с размером пор 0,2 мкм. Концентрирование проводят в режиме

проточной фильтрации с давлением 0,15-0,2 МПа и скоростью материального потока 12-16 дм³ · ч⁻¹. Отмывку концентрированной споровой суспензии проводят дистиллированной водой в соотношении 1:3. Изобретение позволяет исключить инактивацию и уменьшить потери спор до 10% за счет создания щадящих условий концентрирования спор и повысить степень очистки от балластных примесей. 2 табл.

RU 2 151 798 C1

RU 2 151 798 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 151 798** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 3/00, A 61 K 39/07, C**
12 N 1/02/(C 12 N 3/00, C 12 R
1:07)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98112304/13, 24.06.1998

(24) Effective date for property rights: 24.06.1998

(46) Date of publication: 27.06.2000

(98) Mail address:
610024, g.Kirov-24, Oktjabr'skij prospekt
119, NII mikrobiologii

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(72) Inventor: Anker S.S.,
Leshchenko A.A., Kozhukhov V.V., Shevtsov
A.N., Komosko G.V., Savel'ev S.P.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(54) **METHOD OF CONCENTRATING SPORE CULTURE IN PRODUCTION OF ANTHRAX VACCINE PREPARATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology, vaccines.
SUBSTANCE: invention relates to technology of production of medicinal immunobiological preparations. Concentration of spore suspensions in production of vaccine preparation is carried out on porous membranes in regime of cross-flow filtration. For separation of cellular biomass membranes (pore size is 0.2 mcm) are used. Concentration is carried out in regime of cross-flow filtration under pressure

0.15-0.2 MPa at rate of material flow 12-16 dm³ x x h⁻¹. Washing out the concentrated spore suspension is carried out with distilled water in the ratio 1:3. Invention ensures to exclude spores inactivation and decrease their loss to 10% due to providing the sparing conditions in spores concentrating. EFFECT: increased purification degree from inert impurities, decreased loss and inactivation of spores. 2 tbl, 3 ex

RU 2 151 798 C1

RU 2 151 798 C1

Изобретение относится к технологии производства медицинских иммунобиологических препаратов, в частности, к способам концентрирования споровых культур в производстве сибиреязвенных вакцинных препаратов, обеспечивающее стабильность их биологических свойств с сохранением иммуногенности, и может быть использовано в практике производства сибиреязвенных вакцинных препаратов.

При изготовлении споровых концентратов в производстве сибиреязвенных вакцин известен способ осаждения спор. Седimentация споровых суспензий происходит по данной технологии за десять и более суток при температуре 2-4°C, что объясняется повышенной вязкостью жидкой фазы, связанной, прежде всего, с наличием белкового субстрата-продукта лизиса бактериальных клеток и компонентов питательной среды (НИИВС, г. Тбилиси, Грузия).

Этот способ имеет существенные недостатки: процесс ведется в течение длительного времени при низких температурах; препараты, приготовленные на основе этих концентратов, обладают высокой реактогенностью.

Известен способ концентрирования бактериальных спор (авт. свидетельство СССР N 835170 кл. С 12 N 1/002, 1983 г.), сущность которого заключается в том, что в суспензию спор вносят полиэтиленмин в концентрации 0,05-0,1%. За счет введения добавки время осаждения сокращается до 4-5 суток, температура во время осаждения составляет 1-15°C.

Данный способ, хотя и повышает выход микробной биомассы, но одновременно создает трудности в плане освобождения ее от самого осадителя. В условиях промышленного производства вакцинных препаратов для людей наличие осадителя в вакцине крайне нежелательно и, как правило, ухудшает ее качественные характеристики.

Известен способ получения лиобактериофага (авт. свидетельство СССР N 2036232 кл. С 12 N 3/00, 1987 г.), сущность которого заключается в том, что приготовленные фаголизаты очищаются методом ультрафильтрации от метаболитов бактерий и белков питательной среды. Способ позволяет увеличить выход биомассы и степень очистки препарата лиобактериофага. Он показывает принципиальную возможность разделения биологических дисперсных систем. Однако, в нашем случае продуктом является концентрат споровой суспензии, получаемый микрофильтрацией.

Наиболее близким к заявляемому решению является способ промышленного получения споровых концентратов для приготовления сибиреязвенных вакцин центробежным методом (регламент производства живой сухой сибиреязвенной вакцины N 364-95, НИИМ МО РФ, г. Киров, 1995 г.).

Данный способ включает в себя следующие этапы: техническая подготовка сепараторов и металлических воздушных фильтров, термическая стерилизация сепаратора, первичное концентрирование клеточной биомассы, очистка от балластных

примесей стерильной дистиллированной водой в соотношении один к десяти, вторичное концентрирование клеточной биомассы, сбор концентрированной споровой суспензии в стерильную емкость, стерилизацию сепаратора.

Кроме того, в процессе подготовки сепаратора к работе все детали сепаратора моются мыльно-содовым раствором, а затем обрабатываются этиловым спиртом. Проверку герметичности машины осуществляют галлоидным течеискателем ГТИ-6.

Стерилизацию сепаратора проводят термическим способом. Давление пара 0,05-0,06 МПа. Экспозиция составляет 1,9-2,1 часа.

Для получения первичного концентрата споровой суспензии к штуцеру выдачи ее из сепаратора с соблюдением требований асептики подсоединяют две емкости вместимостью 20 дм³ с 10 дм³ стерильной дистиллированной воды, а на линию подачи споровой культуры устанавливают емкость вместимостью 20 дм³ с 10 дм³ стерильной дистиллированной воды. Затем включают сепаратор и подают споровую культуру в полость бокса сепаратора со скоростью 30-40 дм³ • ч⁻¹. В процессе сепарирования в биореакторе поддерживается давление 0,015-0,025 МПа. Следует отметить, что создаваемое вращающейся жидкостью в сепараторе давление на споры соответствует 2,0-2,5 МПа. Через 50-60 минут прекращают подачу споровой культуры и из емкости в полость бокса направляют 1,8-2,1 дм³ стерильной дистиллированной воды для отмывки первичного спорового концентрата. Далее, надев перчатки, смонтированные на боксе сепаратора, разбирают барабан и с помощью специального ножа собирают споровую пасту в стакан. Содержимое последнего ресуспендируют в 0,6-1,2 дм³ стерильной дистиллированной воды, после чего первичный споровый концентрат передают по линии выдачи споровой суспензии из стакана в одну из емкостей с водой, затем ее отсоединяют от штуцера. Время получения первичного концентрата достигает 4 часов (объем перерабатываемой споровой культуры - 80 дм³).

Получение вторичного концентрата. Перед его началом к штуцеру подачи споровой культуры подсоединяют емкость вместимостью 20 дм³ с 10 дм³ стерильной дистиллированной воды и две емкости с отмытым первичным концентратом, на линии выдачи споровой суспензии к штуцеру монтируют стеклянную бутылку вместимостью 5 дм³. Создав давление 0,01-0,02 МПа в расходных емкостях, включают сепаратор, направляют подачу первичного концентрата в барабан сепаратора. Объемный расход составляет 10-12 дм³ • ч⁻¹. Остановку сепаратора осуществляют после переработки первой бутылки с первичным концентратом. Ресуспендирование вторичного концентрата выполняют как описано выше, после чего вторичный концентрат споровой суспензии выгружают в емкость вместимостью 5 дм³. Вторую емкость с первичным концентратом сепарируют аналогично первой. Сбор биомассы производят в емкость, которая установлена на линии выдачи споровой суспензии. Время приготовления вторичного

концентрата до 3,5 часов. Суммарная величина потерь при получении концентрированной споровой суспензии достигает 50% (остатки споровых суспензий в коммуникациях, отбор проб и унос спор с фугатом).

Центробежный способ получения концентрированных суспензий имеет следующие недостатки: низкий выход биомассы клеток из-за потерь; большие энергоёмкость и затраты ручного труда; сложность достижения асептических условий ведения процесса.

По мере увеличения скорости подачи споровых культур в барабан сепаратора возрастает процент потерь, при ограничении скорости подачи потери снижаются за счет меньшего уноса спор с фугатом, но это приводит к увеличению продолжительности процесса и, как следствие, к нагреву биомассы. Превышение нормативного времени сепарирования споровых суспензий влечет за собой рост значений показателя температуры спорового концентрата в пристеночном слое ротора центробежной машины.

Так, при нагреве концентрата в течение часа до температуры 50°C гибель спор составляет 28%, а при прогреве до 60 °C происходит гибель уже 37% спор. Конструкция центробежных машин, применяемых в производстве сибиреязвенных вакцин, позволяет поддерживать приемлемый температурный режим 20-50°C не более 6 часов.

При этом, даже с учетом выбранных рациональных режимов концентрирования расчет полного материального баланса процесса показал, что существенное сокращение общих потерь центробежным методом недостижимо.

Операция отмывки спорового концентрата при сепарации необходима для очистки биомассы от балластных примесей и она выполняется оператором вручную. Это требует больших затрат времени и ручного труда.

Задачей изобретения является получение концентрированных споровых суспензий в асептических условиях, характеризующееся увеличенным выходом биомассы, повышенной степенью очистки от балластных примесей и обеспечивающее щадящие условия концентрирования и создание высокоиммуногенных и нереагентовых вакцинных препаратов.

Для решения поставленной задачи концентрирование осуществляли путем проточной фильтрации через мембранные модули с размером пор 0,2 мкм под давлением 0,15-0,2 МПа со скоростью материального потока 12-16 дм³·ч⁻¹ с последующей очисткой клеточной биомассы в соотношении 1:3.

Сравнение существенных признаков заявляемого способа получения концентрированных споровых суспензий и прототипа показывают, что общим для них является процесс отделения клеточной биомассы, а также ее очистка от балластных примесей с повторным отделением клеточной биомассы.

Существенными отличительными признаками предлагаемого способа являются: отделение клеточной биомассы через

мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм, позволяющее исключить инактивацию и уменьшить потери спор до 10% за счет отсутствия фазового перехода концентрируемого продукта в ходе технологического процесса; скорость материального потока 12-16 дм³·ч⁻¹ при первичном и вторичном концентрировании позволяет увеличить производительность переработки споровой культуры с 80 до 120 дм³ за счет высокой проницаемости мембраны, обеспечивающей большую объемную подачу продукта; предлагаемый режим гидродинамического давления 0,15-0,2 МПа позволяет существенно сократить его неблагоприятное влияние на споры за счет исключения воздействия центробежных сил вращающегося со скоростью 9000 об/мин барабана сепаратора;

объемное соотношение концентрированной споровой суспензии с дистиллированной водой 1: 3 позволяет на порядок эффективнее выполнять процесс отмывки от балластных примесей за счет поддержания в жидком гомогенном состоянии спорового концентрата, способного в большей степени очищаться от примесей, наличие которых характеризуется содержанием общего азота.

Поставленная задача достигается выбором параметров ведения технологического процесса на пористых мембранах и условий, обеспечивающих кратное снижение потерь, стерильность концентрированных препаратов и стабильность их биологических свойств.

Получение концентрированной споровой суспензии на пористых мембранах включает в себя техническую подготовку установки микрофильтрации, проверку КИП, приготовление стерильной дистиллированной воды, а также проверку установки на герметичность, ее стерилизацию и непосредственно получение концентрированной споровой суспензии.

Для решения поставленной задачи применили мембранные модули с размерами пор 0,2 мкм. Кассетный мембранный модуль представляет собой прямоугольный закрытый блок. Он содержит пакет параллельно расположенных фильтров, между которыми проходит слой тканевой подложки. Исходный поток споровой культуры движется внутри подложки в узком зазоре между парами мембран. Подложка из ткани вызывает завихрения в фильтруемой жидкости, которые противодействуют образованию блокирующего слоя и усиливают эффект тангенциального направления потока, подаваемого на мембрану. Каждый модуль по верхнему и нижнему краю снабжен рядом отверстий, которые совпадают с соответствующими отверстиями фильтродержателя установки для организации потока жидкости. Отверстия выполнены в передней и задней зажимных пластинах. Фильтруемая жидкость подается через пять входных отверстий на нижнем крае подложки между фильтрами. Фильтрат выводится через соответствующие пять выпускных отверстий на верхнем крае модуля. Концентрат проходит через четыре оставшихся отверстия на верхнем и нижнем крае.

Данный метод разделения

(концентрирования) биологических дисперсных систем позволяет исключить инактивацию биологических продуктов, практически исключается концентрационная поляризация. За счет незначительного мертвого объема потери продукта минимальны. Мембранные модули стерилизуются как термическим, так и химическим способами. Процесс концентрирования ведется в асептических условиях.

Сущность предлагаемого метода заключается в получении концентрированных споровых суспензий при производстве вакцинных препаратов на пористых мембранах в режиме проточной (кросс-флоу) фильтрации.

Возможность осуществления заявляемого изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Получение концентрированных споровых суспензий мембранным способом с увеличенным выходом биомассы, повышенной степени очистки и высокой иммуногенностью.

Для работы использовали споровые культуры сибиреязвенного микроба вакцинного штамма СТИ-1, полученные способом глубинного культивирования согласно регламента ПР-364-95.

Для концентрирования споровой культуры использовали 1 - 5 модулей "Микросарт" на основе полиолефина с размером пор 0,2 мкм (диаметр пор мембраны выбирали исходя из размеров сибиреязвенного микроба) и площадь фильтрующей поверхности 0,6 м².

Концентрированную суспензию получали путем рециркуляции споровой суспензии через систему (установка с кассетным модулем) с отводом фильтрата в отдельную стерильную емкость. Для ведения процесса экспериментально выбрали технологические параметры, которые представлены в табл. 1.

Из приведенных в таблице 1 данных следует, что экспериментально подобранные параметры позволяют при значениях давления 0,15-0,2 МПа добиться оптимальной скорости подачи споровой суспензии - 12-16 дм³·ч⁻¹. Продолжительность процесса при концентрировании объема 120 дм³ споровой суспензии составляет 6,5-7,5 часов, при этом значение температуры спорового концентрата не превышает 25°C. Коэффициент кратности концентрирования фильтруемого материала по объему равен 8-14 раз, что соответствует центробежному методу разделения при одновременном снижении потерь споровой биомассы с 50% при центробежном, до 8-10% в предлагаемом способе.

Характеристики споровых концентратов, полученных мембранным способом, приведены в таблице 2. Данные таблицы свидетельствуют о том, что значения показателя конечной концентрации спор в препаратах превышают показатели прототипа в среднем в два раза. Все остальные показатели, характеризующие споровые концентраты, соответствуют требованиям регламента живой сухой сибиреязвенной вакцины. Следует отметить, что в вакцине сохраняется высокий уровень содержания жизнеспособных спор и их терморезистентность.

Иммуногенность образцов вакцинных препаратов, полученных по предлагаемой

технологии, полностью удовлетворяет требованиям ФС 42-3269-96. Отсутствие посторонней микрофлоры подтверждает правильность выбора способа стерилизации, вида дезинфектанта, операции отмывки, а также ведения технологического процесса в асептических условиях с предложенным технологическим режимом.

Пример 2. Обеспечение асептических условий процесса.

Экспериментально установлено, что применение 2-3% раствора формалина для текущей и заключительной обработки установки микрофильтрации и кассетных модулей, а также в качестве консерванта мембранных модулей при длительных перерывах в работе, хранении и транспортировании, обеспечивает, в сочетании с герметичным исполнением микрофильтрационного оборудования, стерильность получаемых споровых концентратов. Для этого были экспериментально обоснованы следующие режимы стерилизации:

химическая стерилизация путем рециркуляции 2-3% раствора формалина в течение не менее 40 минут;

отмывка системы от остатков дезинфицирующего раствора 15-20 дм³ стерильной дистиллированной воды.

После выполнения операции отмывки стерильной дистиллированной водой количественное определение формальдегида, проведенное по методу Бланка, показало, что остаточное содержание формальдегида составляет от 0,001 до 0,007%, что соответствует требованиям приказа МЗ СССР N 31 от 13 января 1981 г., предъявляемым к данному виду медицинских иммунобиологических препаратов.

Пример 3. Концентрирование низкоурожайных споровых суспензий.

Для объективной оценки потенциальных возможностей концентрирования мембранным методом использовали низкоурожайные (от 0,5 до 1,0 млрд. спор. см⁻¹) споровые культуры. При использовании низкоурожайных споровых суспензий концентрация спор по завершению процесса микрофильтрации достигала 12-6 млрд. ·см⁻³, что, как и остальные показатели, удовлетворяет регламентным требованиям при производстве сибиреязвенных вакцин. Это не только свидетельствует о высокой концентрирующей способности метода и оптимальности подобранных значений технологических параметров процесса, но и позволяет использовать для производства вакцинных препаратов низкоурожайные споровые культуры - некондиционные для концентрирования центробежным способом согласно регламента ПР-364-95.

Экономическая эффективность и экологическая безопасность.

Важное преимущество мембранной техники в сравнении с центробежными машинами - это их относительно низкая стоимость и незначительные капитальные затраты. Так, стоимость современного герметичного саморазгружающегося сепаратора "Вестфалия" (Германия) составляет один миллион двести рублей, а мембранная установка "Сартокон-2" (Россия)

с комплектом мембранных модулей и технологической оснастки составляет сто двадцать тысяч рублей (в ценах 1998 г.). При этом практически отсутствуют капитальные затраты на создание технологической стадии концентрирования в производстве сибиреязвенных вакцин. Использование химической стерилизации для текущей и заключительной обработки не требует использования пара, что существенно снижает энергоемкость производства. Отличительной особенностью предлагаемого способа концентрирования является отсутствие аэрозолирования биологических продуктов при концентрировании за счет герметичности установки микрофльтрации. Герметичное исполнение установки и низкие значения гидродинамического давления не требуют разработки и создания боксирующих

устройств с целью защиты окружающей среды и обслуживающего персонала от воздействия перерабатываемых биологических продуктов.

Формула изобретения:

- 5 Способ концентрирования споровых культур в производстве сибиреязвенных вакцинных препаратов, включающий отделение клеточной биомассы, ее очистку от балластных примесей с повторным
- 10 отделением клеточной биомассы, отличающийся тем, что концентрирование осуществляют через мембраны с размером пор 0,2 мкм в режиме проточной фильтрации с давлением 0,15 - 0,2 МПа, скоростью
- 15 материального потока 12 - 16 $\text{дм}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$ и с очисткой дистиллированной водой в соотношении 1 : 3.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Параметры ведения процесса концентрирования
мембранным способом

Наименование параметра	Ед. Измерения	Значение параметра
Давление на входе в установку	Мпа	0,15...0,2
Давление на выходе из установки	Мпа	0...0,05
Скорость подачи споровой суспензии	Дм ³ .ч ⁻¹	12...16
Продолжительность процесса концентрирования	ч	6,5...7,5
Кратность концентрирования по объему фильтруемой споровой суспензии	Раз	8...14
Температура концентрированной споровой суспензии в течение процесса	° С	18...25
Объемное соотношение концентрированной споровой суспензии и дистиллированной воды	-	1:3

Примечание. Параметры значений избыточного давления и скорости материального потока споровой суспензии подобраны с учетом максимального снижения возможной гидродинамической инактивации наиболее лабильных биологических структур.

Характеристика концентратов
сибиреязвенного микроба вакцинного штамма СТИ-1,
полученных центробежным и мембранным методами

Оцениваемые показатели Технического результата и их размерность	Результаты полученные	
	Центробежным способом	Мембранным способом
Концентрация спор, млрд.см ⁻³	8,0...15,0	16,9...35
Содержание спор, Нормально окрашенных по Цилю-Нильсену, %	90...95	92...98
Содержание Жизнеспособных спор, %	90...95	90...99
Содержание общего азота, мг. млрд ⁻¹	0,5...0,1	0,04...0,09
Содержание живых спор, млрд.см ⁻³	40...60	45...80
рН, ед. рН	7,4...8,5	8,2...8,5
Терморезистентность, %	35...60	45...70
Иммуногенность, усл. ед.	10000...100000	10000...120000
Наличие Посторонней микрофлоры	не содержит	Не содержит

RU 2151798 C1

RU 2151798 C1